

University of Groningen

Structural investigations of three different proteins by X-ray crystallography and NMR Leucine aminopeptidase ppLAP from *Pseudomonas putida* Competence regulator MecA from *Bacillus subtilis* Actin-regulatory protein SWAP-70 from *Mus musculus*

Kale, Avinash

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Kale, A. (2010). *Structural investigations of three different proteins by X-ray crystallography and NMR Leucine aminopeptidase ppLAP from Pseudomonas putida Competence regulator MecA from Bacillus subtilis Actin-regulatory protein SWAP-70 from Mus musculus*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

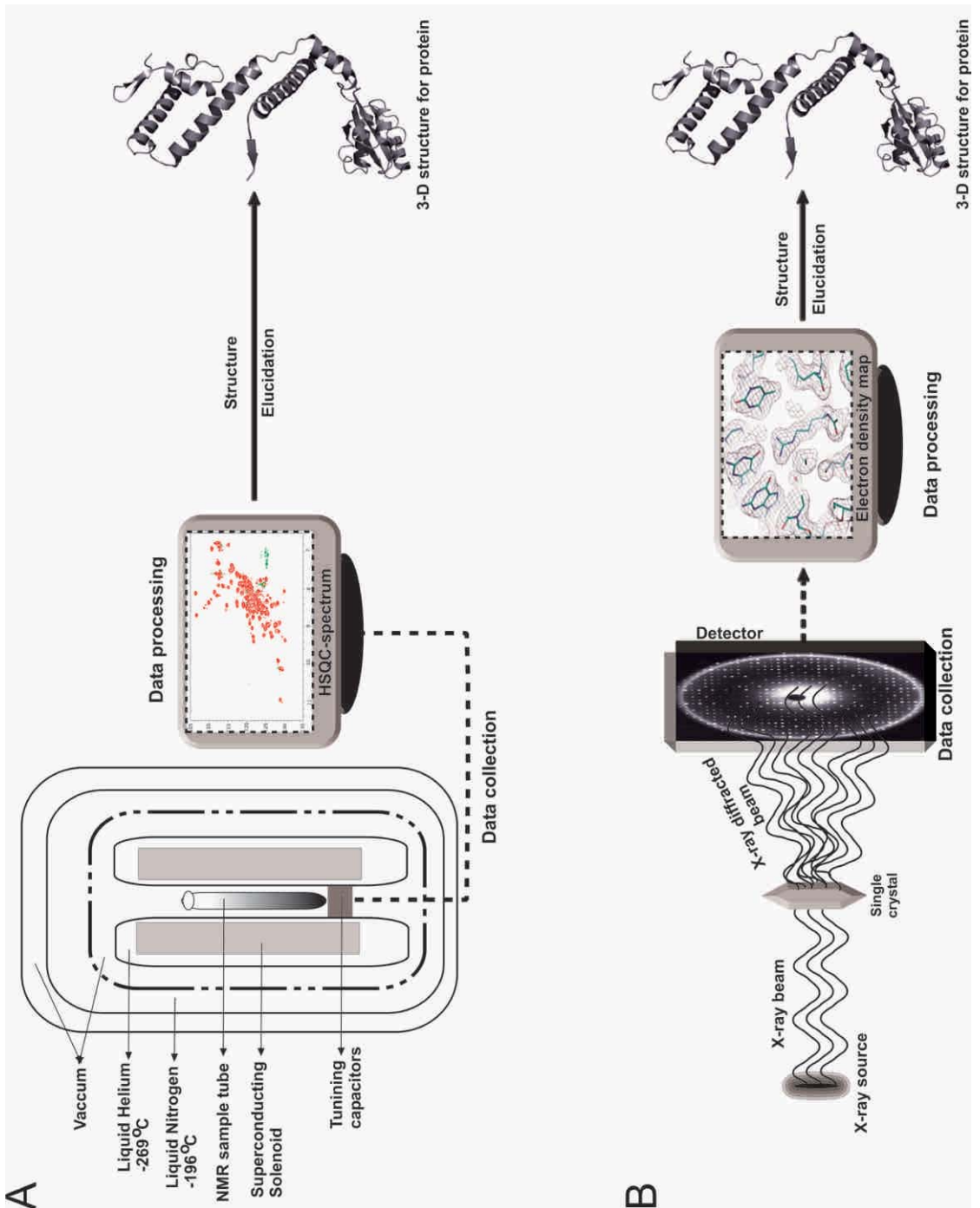
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Kennis van de drie-dimensionale (3D) structuur van eiwitten is essentieel om de werking van biologische systemen volledig te kunnen begrijpen. Twee belangrijke experimentele technieken om in atomair detail structuurinformatie te verkrijgen zijn röntgenkristallografie en kernspinresonantie (NMR) (Figuur 1). Hoewel beide methoden structuren van hoge kwaliteit kunnen opleveren, heeft elke techniek zijn eigen beperkingen en hindernissen. Röntgenkristallografie is afhankelijk van kristallen die röntgenstraling verstrooien, terwijl NMR methoden meestal alleen toepasbaar zijn op kleine (< 30-40 kDa) eiwitten. Bij beide technieken moet het eiwitpreparaat homogeen, stabiel en redelijk tot goed oplosbaar zijn, en het eiwit mag niet irreversibel aggregeren bij hoge concentraties. Zelfs als aan al deze voorwaarden is voldaan, is dat geen garantie dat deze methoden zullen werken. Een succesvolle structuurbepaling is afhankelijk van vele factoren die van eiwit tot eiwit kunnen verschillen. Dit proefschrift beschrijft structurele en functionele studies van drie verschillende eiwitten, uitgevoerd met behulp van zowel röntgenkristallografie als NMR in combinatie met andere, biochemische methoden. Het is verdeeld in drie delen: het eerste deel (hoofdstukken 1 en 2) beschrijft de structuur en functie van leucine aminopeptidase, *ppLAP*, uit *Pseudomonas putida*, het tweede deel (hoofdstukken 3 en 4) bevat structurele en functionele studies van het competentie-gerelateerde adaptor eiwit *MecA* uit *Bacillus subtilis* en het derde deel (hoofdstuk 5) beschrijft structuur-functieonderzoek dat is uitgevoerd aan het SWAP-70 eiwit uit de muis, een eiwit dat in de literatuur is beschreven als een nieuw type “guanine-exchange” factor.



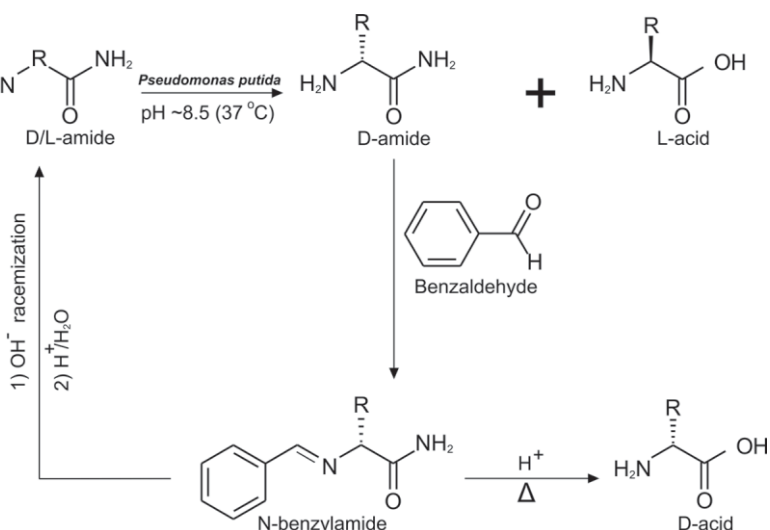
Figuur 1. Schematische weergave van de verschillende stappen (data-collectie, processing, en structuurbepaling) voor: (A) NMR, en (B) röntgenkristallografie

1. Leucine aminopeptidase *ppLAP* uit *Pseudomonas putida*

Leucine aminopeptidasen zijn zink-afhankelijke enzymen die andere eiwitten vanaf hun N-terminus aminozuur voor aminozuur afbreken. **Hoofdstuk 1** bevat een kort overzicht van de structuren en functies van de verschillende leucine aminopeptidasen (LAPs) die momenteel bekend zijn. Deze grote familie van Zn-afhankelijke aminopeptidasen kan worden verdeeld in de M1 en M17 subfamilies. Leden van de M1 familie hebben twee sterk geconserveerde aminozuurvolgorde motieven in hun katalytisch domein: het mono-zink bindingsmotief HEXXH-(X)₁₈-E en het exopeptidase motief GXMEN. Hun biologische rol is divers, maar in het algemeen zijn zij belangrijk voor (1) de afbraak of ontwikkeling van bio-actieve peptiden; (2) vertering van voedsel and (3) intracellulaire afbraak en recycling van eiwitten. M17 LAPs hebben ook sterk geconserveerde aminozuurvolgordes, maar zij missen de HEXXH en GXMEN motieven van de M1 LAPs. M17 LAPs binden in het algemeen twee zink- of mangaan ionen en vormen hexameren. Hun polypeptideketen bestaat uit twee domeinen, een geconserveerd C-terminaal katalytisch domein en een N-terminaal domein, dat kleiner is en meer variabel in aminozuurvolgorde en structuur. M17 LAPs spelen een belangrijke rol in verschillende intra-cellulaire processen zoals (a) bacteriële huishouding; (b) DNA recombinatie; (c) preventie van staar en (d) regulatie van redox potentiaal en pH. De M17 leucine aminopeptidase *ppLAP* uit *Pseudomonas putida* heeft ook een belangrijke industriële toepassing. Dit enzym wordt namelijk gebruikt voor de enantiomere zuivering van racemische mengsels van aminozuren en aminozuur amiden (Figuur 2).

Figuur 2.

Enzymatische scheiding (resolutie) van L- and D-aminozuren en hun amiden uit racemische mengsels.

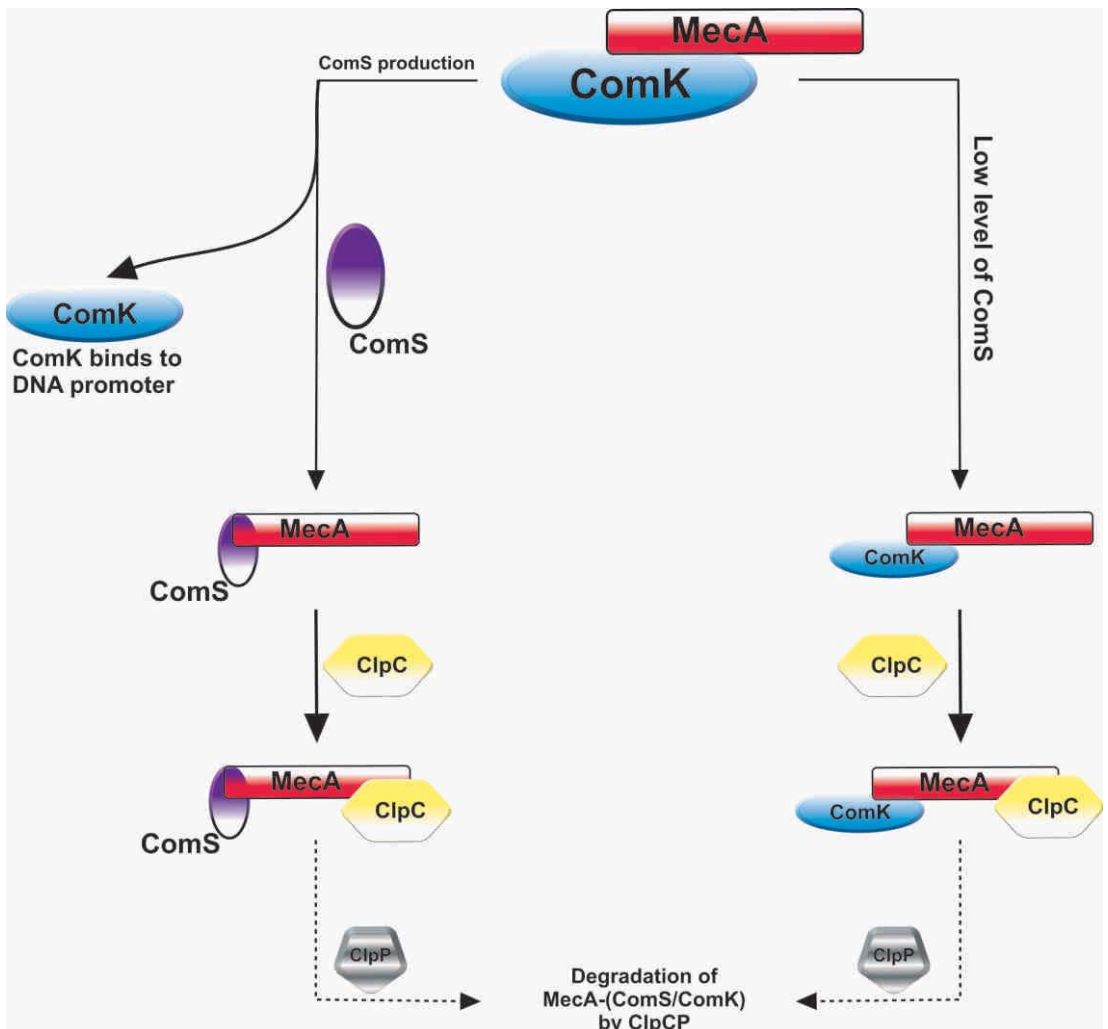


Hoofdstuk 2 beschrijft de opheldering van de 3D atomaire structuur van *ppLAP* met behulp van röntgenkristallografie. Twee natieve kristalstructuren van *ppLAP* zijn bepaald: één met een oplossend vermogen (resolutie) van 2.75 Å, gebruikmakend van kristallen gegroeid in een zure oplossing (pH 5.2), en de ander met een resolutie van 2.20 Å, gebruikmakend van kristallen gegroeid in een basische oplossing (pH 9.5). Bovendien is ook een 1.5 Å kristalstructuur bepaald van een bestatine-gebonden *ppLAP* complex (bestatine is een remmer van metallo-aminoproteasen). Een vergelijking van de twee natieve structuren onthult de cruciale rol van een zink- en een mangaan-ion in het stabiliseren van de driedimensionale conformatie van het actieve centrum en laat zien waarom dit enzym inactief is bij lage pH (hoofdstuk 2, figuur 1B). Analyse van de structuur van het *ppLAP*-remmer complex en een vergelijking met de structuren van sterk verwante homologe eiwitten gaf inzicht in het katalytisch mechanisme, de substraat-specificiteit en de enantioselectiviteit van het enzym (hoofdstuk 2, supplementaire figuur 4 daarin).

2. Het competentie-gerelateerde adaptor eiwit MecA uit *Bacillus subtilis*

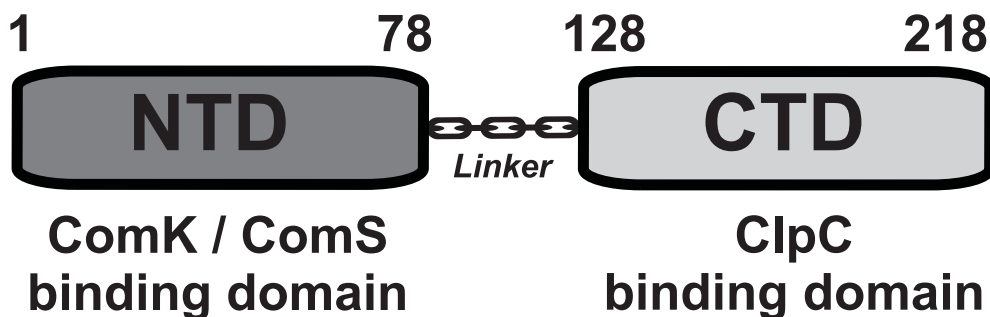
Hoofdstuk 3 vat onze huidige kennis samen over een complex fenomeen in bacteriën dat bekend staat als de ontwikkeling van genetische competentie. Dit is een verfijnd adaptief proces waarbij een subpopulatie van cellen het vermogen ontwikkelt, exogeen DNA uit de omgeving op te nemen. Het opgenomen DNA geeft de bacteriën vervolgens de mogelijkheid nieuwe genetische opties in te bouwen in hun chromosoom voor het overleven onder stress-omstandigheden. De ontwikkeling van genetische competentie is het meest bestudeerd in *Bacillus subtilis*. Wanneer zich stress-omstandigheden voordoen, bijvoorbeeld bij een tekort aan voedingsstoffen, initieert *B. subtilis* een complex adaptief proces, dat o.a. uitmondt in de productie van een DNA import systeem en een systeem om DNA in het chromosoom op te nemen. De transcriptionele activering van de genen die dit competentieapparaat coderen wordt gecontroleerd door de competentieregulator ComK. De hoeveelheid ComK in de cel wordt strikt gereguleerd door een netwerk van eiwit-eiwit en eiwit-DNA interacties. Dit netwerk concentreert zich rond een complex tussen ComK, het adaptor eiwit MecA en de AAA+ ATPase ClpC, dat

functioneert als een moleculaire schakelaar (figuur 3). Bij optimale groei-omstandigheden zorgt het ComK-MecA-ClpC complex er voor dat ComK wordt afgebroken door de ClpCP protease. Op deze wijze blijven de intra-cellulaire ComK hoeveelheden laag en ontwikkelt geen van de cellen genetische competentie. Stressomstandigheden daarentegen leiden tot de productie van ComS, een klein, quorum-sensing gerelateerd eiwit. ComS bindt aan MecA, waarbij het de bindingsplaats voor ComK blokkeert. Het resultaat is dat ComK loslaat van MecA-ClpC, waardoor het niet langer wordt afgebroken. De toename van de ComK concentratie in de cel zorgt er vervolgens voor dat het proces van competentie-



Figuur 3. De ComK / ComS-MecA-ClpC competentie schakelaar.

ontwikkeling wordt aanzet. Verondersteld wordt dat MecA uit twee aparte domeinen bestaat (figuur 4), een N-terminaal domein dat bindt aan ComS en ComK, en een C-terminaal domein dat bindt aan ClpC. Het ontbreken van 3D-structuur informatie heeft tot nu toe een goed inzicht in hoe MecA andere eiwitten herkent in de weg gestaan.

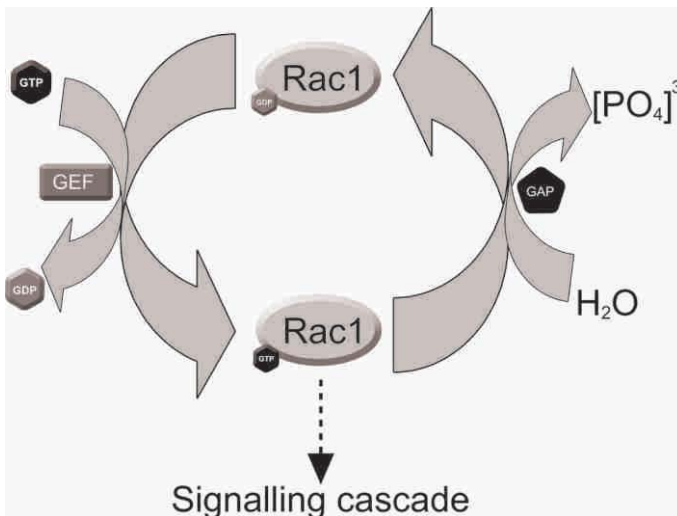


Figuur 4. De voorspelde domein-architectuur van MecA.

Hoofdstuk 4 beschrijft de pogingen die zijn ondernomen om het volledige MecA eiwit te kristalliseren, en ook een MecA fragment dat alleen het N-terminale domein bevat. Omdat geen röntgenlicht-verstrooiende kristallen konden worden gegroeid, is geprobeerd de 3D-structuur van MecA op te helderen met behulp van NMR spectroscopie. NMR studies uitgevoerd met verschillende eiwitconstructen maakten het uiteindelijk mogelijk de secundaire structuur van het N-terminale domein van MecA te bepalen. Een volledige 3D-structuurbepaling bleek niet mogelijk, omdat het MecA eiwit dynamische aggregaten vormde. Door bindingsstudies werd bevestigd dat de aanwezigheid van het N-terminale domein van MecA voldoende is voor de binding van ComK. Mede gebaseerd op de NMR structuur studies wordt een model voorgesteld van geoligomeriseerd MecA, waarin het C-terminale domein betrokken is bij dimerisatie van het eiwit. De resultaten zijn in tegenspraak met het model dat is voorgesteld door Persuh *et al.*, 1999, waarin zowel het N- als C-terminale domein van MecA zijn betrokken bij dimerisatie.

3. Het actine-netwerk regulerende eiwit SWAP-70 uit *Mus musculus*

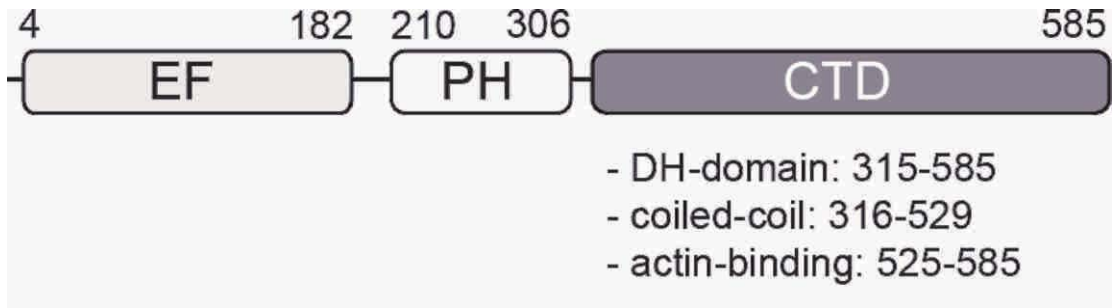
Hoofdstuk 5 beschrijft structuur en functie onderzoek van het eiwit SWAP-70 (“70-kDa switch-associated protein”) uit *Mus musculus* (muis). Dit eiwit werd oorspronkelijk geïsoleerd als een onderdeel van een groot complex geassocieerd met “immunoglobulin class switching”. Dit is een DNA recombinatieproces dat anti-lichaam-producerende B cellen in staat stelt om te schakelen (switchen) naar een ander iso-type van een antilichaam (immunoglobuline), zonder de antigeen-specificiteit van het antilichaam te veranderen. Latere studies brachten echter een andere functie van SWAP-70 aan het licht. Ontdekt is dat dit eiwit werkt als een Rac-specifieke “guanine-exchange” factor (GEF) die betrokken is bij de controle van actine dynamica en verrimpeling van het membraan (“membrane ruffling”). Het eiwit Rac behoort tot de zogenaamde Rho-familie van kleine GTPasen. Rho-GTPasen reguleren een breed scala aan cellulaire processen, waaronder herordening van het actine cyto-skelet, gen expressie, transport over membranen en transformatie van kwaadaardige cellen (bv. In het geval van kanker). Deze eiwitten kunnen zich in twee toestanden bevinden: een GDP-gebonden toestand of een GTP-gebonden toestand, die verschillen in conformatie en in specificiteit voor hun eiwit partners. Deze eigenschap geeft hun het vermogen te functioneren als moleculaire schakelaars. De omschakeling



van de inactieve, GDP-gebonden toestand naar de actieve, GTP-gebonden toestand wordt gekatalyseerd door Rho-specifieke GEFs (Rho-GEFs), terwijl het omgekeerde proces (van GTP-gebonden naar GDP-gebonden toestand) wordt gekatalyseerd door GTPase activerende eiwitten (GAPs) (figuur 5).

Figuur 5. Mechanistisch schema voor een Rho-GTPase afhankelijke signaal-cascade, gecontroleerd en/of gekatalyseerd door GAPs of GEFs.

Rho-GEFs waarvan de structuur is opgehelderd hebben een gemeenschappelijke architectuur die bestaat uit een Dbl-homologie (DH) domein en een pleckstrin-homologie (PH) domein. Het DH domein is verantwoordelijk voor de GEF activiteit en voor de binding van het target Rho-GTPase, terwijl het PH domein zorgt voor de lokalisatie van de GEFs bij het plasma-membraan via de binding van phospho-inositiden. In alle Rho-GEFs die tot dusverre zijn gekarakteriseerd zit het PH domein achter het DH domein, wat suggereert dat deze twee op een speciale en specifieke manier met elkaar samenwerken. SWAP-70 bevat een C-terminaal domein dat een zwakke homologie vertoont met DH domeinen. Het heeft ook een PH domein, maar verrassend genoeg zit dit domein voor, en niet achter het DH domein (figuur 6). Om te kunnen begrijpen hoe SWAP-70 werkt als een Rho-GEF met een PH-DH module, in plaats van de gebruikelijke DH-PH module, is een 3D structuur van dit eiwit zeer wenselijk. Verschillende constructen werden ontworpen voor de productie en zuivering van het volledige SWAP-70, en ook van verschillende fragmenten met de PH en/of DH domeinen. Ondanks een uitgebreide kristallisatiescreening bleek het niet mogelijk röntgenlicht-verstrooiende kristallen te groeien van deze eiwitten. Bovendien was het niet mogelijk te bevestigen, dat SWAP-70 een binding aangaat met Rac en ook kon van geen van de SWAP-70 eiwitten een Rac-specifieke GEF activiteit worden aangetoond. Een mogelijke verklaring voor dit gebrek aan succes is dat de geproduceerde eiwitten niet goed waren opgevouwen en daardoor inactief waren. Echter, zoals aangevoerd in dit proefschrift, en ook door anderen, kan niet uitgesloten worden dat SWAP-70 helemaal geen DH domein heeft, en mogelijk zelfs geen GEF activiteit vertoont. Een analyse van de aminozuurvolgorde van SWAP-70 laat zien dat het C-terminale domein hoogstwaarschijnlijk een zogenaamd “coiled-coil” gebied vormt, dat significant afwijkt van de opvouwing van een DH-domein. Zo’n “coiled-coil”-gebied is meestal betrokken bij dimerisatie, en deze functie kon in deze studie inderdaad ook worden aangetoond voor het C-terminale domein van SWAP-70. Verdere studies zijn echter noodzakelijk om overtuigend vast te stellen of SWAP-70 wel of niet werkt als Rac-specifieke GEF, en om een 3D structuurbepaling van dit eiwit mogelijk te maken. Een succesvolle kristallisatie hangt ondermeer af van een verbetering in het gedrag van de eiwitten, wat mogelijk verkrijgen kan worden door toepassing van een ander (eukaryotisch) expressie systeem.



Figuur 6. Domein topologie van SWAP-70.